

SUBSTANCE FOR IMPROVEMENT OF TASTE

Patent number: JP3190899
Publication date: 1991-08-20
Inventor: KURIHARA YOSHIE
Applicant: KURIHARA YOSHIE; ASAHI DENKA KOGYO KK
Classification:
- International: A23J1/14; A23L1/03; A23L1/22; C07K14/415; A23J1/00;
A23L1/03; A23L1/22; C07K14/415; (IPC1-7): A23J1/14;
A23L1/03; A23L1/22; C07K13/00
- european:
Application number: JP19890330794 19891220
Priority number(s): JP19890330794 19891220

[Report a data error here](#)**Abstract of JP3190899**

NEW MATERIAL: A substance for improvement of taste having an amino acid sequence represented by the formula. **USE:** A sweetening substance for foods, beverages, feeds, pet foods, medicines, etc. **PREPARATION:** For example, water is added to sarcocarp of gluculigo latifolia and the resultant mixture is homogenized. The homogenized mixture is centrifuged and the resultant precipitate is collected. To the collected precipitate, 0.5N sodium chloride is added followed by homogenization. The homogenized material is centrifuged and a supernatant is collected. To the collected crude extract, ammonium sulfate is added till the concentration is 80% saturation and the generated precipitate is separated by centrifugation. The separated precipitate is then dissolved in 0.01M phosphate buffer solution and the obtained solution is subjected to an ion-exchange chromatography. The adsorbed substances are eluted by the linear-concentration gradient elusion method using 0-1.0 M sodium chloride solution and the eluted active fraction is treated using the molecular sieve chromatography method and purified, thus obtaining the objective substance for improvement of taste having an amino acid sequence of the formula.

Ile¹ Asn² Val³ Leu⁴ Leu⁵ Ser⁶ Gly⁷ Gln⁸ Thr⁹ Leu¹⁰
His¹¹ Ile¹² Asp¹³ His¹⁴ Ser¹⁵ Leu¹⁶ Gln¹⁷ Ala¹⁸ Gly¹⁹ Ala²⁰
Tyr²¹ Thr²² Leu²³ Thr²⁴ Ile²⁵ Gln²⁶ Asn²⁷ Asn²⁸ Cys²⁹ Asn³⁰
Leu³¹ Val³² Lys³³ Tyr³⁴ Gln³⁵ Asn³⁶ Gly³⁷ Arg³⁸ Gln³⁹ Ile⁴⁰
Trp⁴¹ Ala⁴² Ser⁴³ Asn⁴⁴ Thr⁴⁵ Ile⁴⁶ Asp⁴⁷ Arg⁴⁸ Arg⁴⁹ Gly⁵⁰ Ser⁵¹
Gly⁵² Cys⁵³ Arg⁵⁴ Leu⁵⁵ Thr⁵⁶ Leu⁵⁷ Ser⁵⁸ Asp⁵⁹ Gly⁶⁰
Asn⁶¹ Leu⁶² Val⁶³ Ile⁶⁴ Tyr⁶⁵ Asp⁶⁶ His⁶⁷ Ile⁶⁸ Asn⁶⁹ Asn⁷⁰
Asp⁷¹ Val⁷² Asn⁷³ Gly⁷⁴ Ser⁷⁵ Ala⁷⁶ Cys⁷⁷ Gly⁷⁸ Asp⁷⁹
Ala⁸⁰ Gly⁸¹ Lys⁸² Tyr⁸³ Ala⁸⁴ Leu⁸⁵ Val⁸⁶ Leu⁸⁷ Gln⁸⁸ Lys⁸⁹
Asp⁹⁰ Gly⁹¹ Arg⁹² Phe⁹³ Val⁹⁴ Ile⁹⁵ Tyr⁹⁶ Gly⁹⁷ Pro⁹⁸ Val⁹⁹
Leu¹⁰⁰ Trp¹⁰¹ Ser¹⁰² Leu¹⁰³ Gly¹⁰⁴ Pro¹⁰⁵ Asn¹⁰⁶ Gly¹⁰⁷ Cys¹⁰⁸ Arg¹⁰⁹
Arg¹¹⁰ Val¹¹¹ Asn¹¹² Gly¹¹³

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑫公開特許公報(A) 平3-190899

⑬Int.Cl.⁵

C 07 K 13/00
 A 23 J 1/14
 A 23 L 1/03
 // A 23 L 1/22

識別記号

ZNA

府内整理番号

8619-4H
 7236-4B
 6977-4B
 7823-4B
 6977-4B

⑭公開 平成3年(1991)8月20日

ZNA Z

A 23 L 1/03

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全12頁)

⑮発明の名称 味覚修飾物質

⑯特 願 平1-330794

⑰出 願 平1(1989)12月20日

⑱発明者 栗原 良枝 東京都世田谷区奥沢7-4-7

⑲出願人 栗原 良枝 東京都世田谷区奥沢7-4-7

⑳出願人 旭電化工業株式会社 東京都荒川区東尾久7丁目2番35号

㉑代理人 弁理士 羽鳥 修

明細書

1. 発明の名称

味覚修飾物質

2. 特許請求の範囲

下記のアミノ酸配列を有する味覚修飾物質。

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu¹⁰
 His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala²⁰
 Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Asn Cys Asn³⁰
 Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile⁴⁰
 Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser⁵⁰
 Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly⁶⁰
 Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn⁷⁰
 Asp Val Asn Gly Ser Ala Cys Cys Gly Asp⁸⁰
 Ala Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys⁹⁰
 Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val¹⁰⁰
 Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg¹¹⁰
 Arg Val Asn Gly¹¹⁴

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、クルクリゴ・ラチフォリアの果実か

ら分離した味覚修飾物質クルクリンを、さらに精製して得た高純度の味覚修飾物質に関する。

(従来の技術)

舌の受容膜に作用して、食品の味覚を変える物質(味覚修飾物質)としては、従来、口中に含んだ後、甘味物質を食した時、または甘味物質とともに食した時、甘味を感じさせなくするものとしてギムネマ シルベスター (*Gymnema sylvestre*) の葉に含まれるギムネマ酸、及びなつめ (*Ziziphus jujuba*) の葉に含まれるジジフィンが知られており、また上記と同様にして酸味物質を食した時、甘味を感じさせるものとして、ミラクリフルーツ (*Synsepalum dulcificium*) の実に含まれるミラクリンが知られている。

上記のミラクリンは、上述の如き機能を有するものであるが、安定性上の問題があり、味覚修飾物質として実用化されていない。

また、クルクリゴ ラチフォリア (*Curculigo latifolia*) は、西マレーシアやタイ南部等に自生するひがんばな科きんばいざさ属の植物であり、

その果実は食用に適し、食欲増進効果があることは知られているが、それ以外の性質については知られていない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明者らは、先に、クルクリゴ・ラチフォリア (Curculigo latifolia) の果実またはその乾燥物から 0.01M 以上の濃度の塩の水溶液で抽出することによって得られる蛋白質（クルクリンと命名）は、これを食した後、水または酸味物質を飲食すると、甘味を感じさせる味覚修飾効果を有する蛋白質であることを見出した（特願昭 63-153143 号及び特願昭 63-277717 号）。

本発明は、上記クルクリンを高度に精製した高純度のクルクリン（以後、高純度クルクリンという）からなる味覚修飾物質を提供するもので、そのアミノ酸配列も決定されたものである。

(課題を解決するための手段)

本発明の味覚修飾物質は、次のアミノ酸配列を有する。

3

になるまでこの水洗操作を繰り返し、沈渣を得る。どの上清にも、味覚修飾活性はない。

統いて、得られた沈渣を 0.01M 以上の濃度の塩の水溶液で抽出して、クルクリンを含む粗抽出液を得る。

上記の塩としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムの塩酸塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムのリン酸塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムの炭酸塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムの硫酸塩又は亜硫酸塩、ナトリウム若しくはカリウムの硝酸塩又は亜硝酸塩、ナトリウム若しくはカルシウムの乳酸塩、ミョウバン、焼ミョウバン、酢酸ナトリウム、ナトリウム若しくはカリウムのピロリン酸塩、ナトリウム若しくはカルシウムのプロピオン酸塩、安息香酸ナトリウム、フマル酸ナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム等が用いられる。

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu¹⁰
His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala²⁰
Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Asn Cys Asn³⁰
Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile⁴⁰
Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser⁵⁰
Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly⁶⁰
Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn⁷⁰
Asp Val Asn Gly Ser Ala Cys Cys Gly Asp⁸⁰
Ala Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys⁹⁰
Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val¹⁰⁰
Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg¹¹⁰
Arg Val Asn Gly¹¹⁴

以下、本発明の味覚修飾物質について詳述する。

本発明の味覚修飾物質は、例えば、次のようにして得られる。

まず、クルクリゴ・ラチフォリアの果実又はその果肉に、水を加えてホモジナイズし遠心分離する。この時上清は、濃い褐色を示す。さらに、この沈渣に当初の果実又はその果肉と等量の水を加えてホモジナイズし、遠心分離する。上清が無色

4

上記塩の水溶液による抽出手段の一例をあげると、次の通りである。上記水洗操作後、得られた沈渣に塩化ナトリウム水溶液を加えてホモジナイズし、遠心分離又は濾過を行って、クルクリンを含む粗抽出液を得る。

次いで、上記のクルクリンを含む粗抽出液を以下の通り精製し、高純度クルクリン（本発明の味覚修飾物質）を得る。

上記粗抽出液の精製は、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどで塩析し、通常のクロマトグラフィーによって行うことができる。一例としては、硫酸アンモニウムで塩析して得られた沈殿を、CM-セファロースイオン交換クロマトグラフィーにかけ、さらに分子ふるいクロマトグラフィーにかけることによって、高純度クルクリンが得られる。

高純度クルクリンのアミノ酸配列の決定は、該高純度クルクリンをトリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素で加水分解し

た後、水系の逆相のカラムを用い HPLC で各ペプチドフラグメントを精製し、さらに、このペプチドフラグメントの構造を決定することによって行う。

又、高純度クルクリンは、前記のアミノ酸配列を有するので、このアミノ酸配列通りに、適当な合成方法、例えば、固相合成、部分固相合成、フラグメント縮合又は溶液合成によって合成してもよいし、適当な宿主を選び、組み換えDNA技術を用いても得ることができるものである。

(実施例)

実施例 1 (水洗および塩化ナトリウム水溶液による抽出)

クルクリゴ・ラチフォリアの果肉 30 g をとり 40 mL の水を加えてホモジナイズし、遠心分離 (12, 500 rpm、60 分間) した。この上清は褐色を示し、味覚修飾活性はなかった。さらに得られた沈渣に、40 mL の水を加えてホモジナイズし、遠心分離 (12, 500 rpm、20 分間) した。この上清は、無色で、味覚修飾活性はなか

7

0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で素通り画分を除去した後、塩化ナトリウム溶液 0~1.0 M の直線濃度勾配溶出法でクルクリンを溶出した (流速 5 mL/1 時間、1 分画 5 mL、全溶出液量 500 mL)。溶出した蛋白質は 280 nm の吸収によりモニターした。その結果を第 1 図に示した。第 1 図に示すピーク (B) が味覚修飾物質クルクリンを含む画分である。

実施例 4 (分子ふるいクロマトグラフィー)

実施例 3 で得られた、第 1 図のピーク (B) の斜線部分に示された画分に、80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して活性物質を析出させた。これを遠心分離 (32, 000 rpm、60 分間) して得た沈澱を、1.5 mL の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した。この濃縮液をセファデックス (ファルマシア LKB バイオテクノロジー社製) G-100 カラム (直径 1.6 cm × 58 cm、ベッド体積 160 mL) を用い 0.5 MNaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) により分離した (流速 8.4 mL/

た。

次に、得られた沈澱に 0.5 M 塩化ナトリウム水溶液を加えてホモジナイズし、遠心分離 (30, 000 rpm、60 分間) した。得られた上清は、無色で、味覚修飾活性を示した。さらに、40 mL の 0.5 M 塩化ナトリウム水溶液による抽出操作を 3 回繰り返し、これら 3 回分の上清を合わせ、クルクリンを含む粗抽出液を得た。

実施例 2 (硫酸アンモニウムによる塩析)

実施例 1 で得られた粗抽出液に、80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して活性物質を析出させた。これを遠心分離 (32, 000 rpm、60 分間) して得た沈澱を、100 mL の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した。

実施例 3 (CM-セファロースイオン交換クロマトグラフィー)

実施例 2 で得られた溶液を、CM-セファロース CL-6B カラム (直径 2.2 cm × 18 cm、ベッド体積 68 mL、ファルマシア LKB バイオテクノロジー社製) に流し吸着させた。続いて、

8

1 時間、1 分画 2.8 mL、全溶出量 182 mL)。蛋白質は 280 nm の吸収によりモニターした。その結果を第 2 図に示した。第 2 図に示すピーク (A) が味覚修飾物質クルクリンを含む画分である。

参考例 1 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

実施例 4 で得られた、第 2 図のピーク (A) の斜線部分に示された画分の物質の純度および分子量を、8 M 尿素を含む、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。

その結果、分子量 12,000 ダルトン (da ton) のところに単一バンドを示したことから、第 2 図のピーク (A) の斜線部分に示された画分の味覚修飾物質クルクリンは、純品であることが確認できた。

クルクリゴ・ラチフォリアの果肉 30 g から得られた、各クルクリン画分の蛋白質含量、活性率及び精製度は下記第 1 表に示す通りである。

尚、蛋白質含量は、ローリー (Lowry) ら

の方法により測定した。

第1表 クルクリンの各精製段階における蛋白質含量、活性收率及び精製度

精 製 段 階	蛋白質含量 (g)	活性收率 (%)	精製度 (倍)
果 肉	30**	100	1
0.5M食塩水抽出物	0.106	80.0	225
CM-セファローズ 溶 出 画 分	0.018	55.5	940
セファデックスG-100 溶 出 画 分	0.0086	36.0	1255

*1: 果肉重量(蛋白質以外の成分も含む)

又、活性は、試料を3分間口に含んだ後水で口をすすぎ、0.02Mクエン酸溶液を味わった時の甘さを各種濃度のショ糖溶液と比較し、同等の甘さのショ糖濃度を求めることにより測定した。

その結果を第3図に示す。第3図から判るように、高純度クルクリンの活性は、0.3Mショ糖の甘さに相当した。

参考例2(等電点電気泳動)

ファーストシステム(Phast System)

1 1

TAおよび6.0 mMジチオスレイトールを含む0.4Mトリス緩衝液5mLに溶解した。この溶液を窒素ガス中で37℃、24時間インキュベートした。この溶液にヨードアセトアミド0.2gを加え、室温で10分間静置し、続いて、氷水浴中で60分間静置した。得られるS-カルボキシアミドメチル化クルクリンをセファデックスG-25を用い、2M尿素及び2 mM EDTAを含む5.0 mM重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)に溶媒を交換し酵素消化の試料とした。

実施例7(S-カルボキシアミドメチル化クルクリンの酵素消化)

S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシルエンドペプチダーゼ消化を、2M尿素及び2 mM EDTAを含む5.0 mM重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)中で37℃、17.5時間行った。蛋白質濃度は1 mg/mLで、酵素対基質比が1対1.20(W/W)である。反応は、HClを加えpH 2.0とすることにより停止した。

また、S-カルボキシアミドメチル化クルクリ

TM、ファルマシア LKB バイオテクノロジー社
製)により、ファーストゲル(Phast Gel
IEF 5-8)を用いて、高純度クルクリンの等電点電気泳動を行ったところ、等電点は7.1であった。

実施例5(アミノ酸組成)

アミノ酸組成の決定は、ウォーターズ社のピコタグシステム(Waters Picotag system)により実施した。即ち、高純度クルクリンの10 μgを1%フェノールを含む6N-HClにより、110℃22時間の条件で加水分解し、得られたアミノ酸をフェニルチオカルバミル(PTC)化して、TSKゲルODS-80TMカラム(直徑0.46 cm × 15 cm、東ソー製)を用いたHPLCにより分析した。PTC-アミノ酸は、254 nmの吸光度により検知した。

実施例6(S-カルボキシアミドメチル化クルクリンの調製)

実施例1~4の操作により得られた高純度クルクリン7 mgを、6Mグアニジン塩酸塩、2 mM ED

1 2

ンのキモトリプシン消化を、上記消化と同じ緩衝液、蛋白質濃度及び酵素対基質比の下、37℃、30分間行った。消化反応は上記と同じ方法で停止した。

さらに、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのトリプシン消化を、上記消化と同じ緩衝液、蛋白質濃度及び酵素対基質比の下、37℃、3時間行った。消化反応は上記と同じ方法で停止した。

実施例8(ペプチドの分離)

実施例7により得られた三種類のペプチド混合物は、TSK-ODS-120T(東ソー製)カラムを用い、HPLCにより分離した。各ペプチドは、0.05%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法で溶出した。ペプチドは、210 nmの吸収により検知され、各ピークが集められた。

リシルエンドペプチダーゼ消化物、キモトリプシン消化物及びトリプシン消化物のHPLC溶出パターンを、それぞれ第4図、第5図及び第6図に示す。

ただし、リシルエンドペプチダーゼ消化物及びトリプシン消化物については、アセトニトリル 20% (W/W) から 40% (W/W) までの 30 分間の直線濃度勾配溶出パターンであり、キモトリプシン消化物については、アセトニトリル 10% (W/W) から 40% (W/W) までの 45 分間の直線濃度勾配溶出パターンである。又、後述するペプチドの名前は、これらの HPLC 溶出パターン中のピークの名前に従った。

実施例 9 (アミノ酸組成分析及びアミノ酸配列の決定)

実施例 8 で得た各ペプチドのアミノ酸組成分析は、ウォーターズ社のピコタグシステム (Waters Picotag system) により実施し、その結果を下記第 2 表及び下記第 3 表に示した。ただし、セリン及びトレオニンは、それぞれ分解による損失を 10% 及び 5% として補正した値を示した。

アミノ酸配列の決定は、470A アプライドバイオシステムプロテインシークエンサー (Applied Biosystem Protein Sequencer) により行っ

た。即ち、アミノ酸をフェニルチオヒドントイン (PTH) 化して、この PTH-アミノ酸を、TSK-ODS-120T カラムを用いた HPLC により分析した。その結果を下記第 4 表及び下記第 5 表に示す。

カルボキシ末端アミノ酸配列は、カルボキシペプチダーゼを用いて次の方法により決定した。高純度クルクリン 200 μg を、0.1M N-エチルモルホリン酢酸緩衝液 (pH 8.0) 0.9 mL に溶解する。この溶液に、カルボキシペプチダーゼ A を 10 μg 加え、反応混合物を室温でインキュベートする。反応液の一部を、15分、30分、60分及び 120 分毎に採取する。これらの反応液にトリクロル酢酸を加え蛋白質を沈殿させ、これを遠心分離により除き、上清にある遊離したアミノ酸を、ウォーターズ社のピコタグシステム (Waters Picotag system) により分析した。その結果、カルボキシ末端アミノ酸残基は、グリシンであることが明らかとなった。

以上 の方法により決定されたアミノ酸配列は、

15

第 7 図に示す通りである。

第 7 図において、LEP, CH 及び T は各々リシルエンドペプチダーゼ、キモトリプシン及びトリプシン消化からのペプチドを、N は高純度クルクリンの N 末端からエドマン分解により決定したアミノ酸配列を示す。

また、実線は、各ペプチドのエドマン分解により同定されたアミノ酸残基を示し、点線は、各ペプチドのエドマン分解により同定されなかったアミノ酸残基を示す。

また、アルファベットとアミノ酸との関係は次の通りである。

	3 文字表記	1 文字表記
アスパラギン酸	Asp	D
アスパラギン	Asn	N
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
メチオニン	Met	H
システイン	Cys	C
セリン	Ser	S

16

グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
トレオニン	Thr	T
アラニン	Ala	A
プロリン	Pro	P
アルギニン	Arg	R
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
フェニルアラニン	Phe	F
リシン	Lys	K
トリプトファン	Trp	W



第2表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシルエンドペプチダーゼ又はトリプシン消化物より得られたペプチドのアミノ酸組成

アミノ酸	単位(モル/ペプチドのモル)					
	LEP-2	LEP-3	LEP-5	LEP-6	T-11 クルクリン	
Asx(B)	5.4(6)	13.0(12)	2.7(3)	8.9(9)	(21)	
Glx(Z)	1.2(1)	3.2(3)	2.4(2)	1.4(1)	(6)	
Cys(C)	0.7(1)	2.4(3)	0.8(1)	1.7(2)	(5)	
Ser(S)	2.3(2)	3.8(4)	1.1(1)	2.5(2)	(7)	
Gly(G)	2.6(2)	6.9(7)	4.7(5)	4.4(4)	(14)	
His(H)	2.2(2)	1.1(1)		1.2(1)	(3)	
Thr(T)	3.0(3)	2.0(2)		1.2(1)	(5)	
Ala(A)	0.8(1)	3.4(3)	3.7(3)	2.8(3)	(7)	
Pro(P)			2.3(2)		(2)	
Arg(R)			3.8(4)	3.4(3)	(7)	
Tyr(Y)	1.0(1)	1.0(1)	1.9(2)	1.1(1)	1.9(2)	(5)
Val(V)	1.1(1)	1.7(2)	1.7(2)	2.2(3)	2.5(3)	(8)
Ile(I)		1.0(1)	1.9(2)	0.7(1)	0.7(1)	(4)
Leu(L)	2.1(2)	5.2(6)	3.8(4)	2.1(2)	5.9(6)	(14)
Phe(F)				1.2(1)		(1)
Lys(K)	0.8(1)	0.9(1)	0.9(1)		2.3(2)	(3)
Trp(W)			ND(1)	ND(1)		(2)
計	(7)	(33)	(50)	(24)	(37)	(114)
帰属	84-90	1-33	34-83	91-114	54-90	
収率(%)	55.2	72.4	83.0	68.5	31.3	

セリン及びトレオニンは、それぞれ分解による損失を10%及び5%として補正した値を示す。

第3表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのキモトリプシン消化物より得られたペプチドのアミノ酸組成
単位(モル/ペプチドのモル)

アミノ酸	CH-H3	CH-4B	CH-5	CH-6	CH-10	CH-13
Asx(B)	2.0(2)*	1.0(1)	3.2(3)	3.0(3)	9.9(11)	1.4(1)
Glx(Z)		2.0(2)	1.4(1)	1.9(2)		0.8(1)
Cys(C)	0.7(1)		0.6(1)		2.3(3)	
Ser(S)	1.0(1)			2.0(2)	4.2(4)	
Gly(G)	2.5(3)	1.1(1)		2.1(2)	6.6(6)	2.2(2)
His(H)				1.8(2)	1.2(1)	
Thr(T)			1.6(2)	1.1(1)	1.7(2)	
Ala(A)				3.1(3)	2.4(3)	0.7(1)
Pro(P)	1.3(1)					1.2(1)
Arg(R)	1.8(2)	1.1(1)			3.3(3)	1.3(1)
Tyr(Y)			1.2(1)	1.0(1)	2.3(2)	1.2(1)
Val(V)	1.2(1)		0.7(1)	0.9(1)	1.9(2)	2.4(3)
Ile(I)		0.8(1)	0.8(1)		1.1(1)	1.0(1)
Leu(L)	1.3(1)		1.6(2)	4.2(4)	4.5(4)	2.7(3)
Phe(F)						1.0(1)
Lys(K)			0.8(1)		0.9(1)	0.7(1)
Trp(W)		ND(1)**			ND(1)	*
計	(12)	(7)	(13)	(21)	(43)	(18)
帰属	103-114	35-41	22-34	1-21	42-84	85-102
収率(%)	6.1	18.9	17.5	38.1	15.0	19.3

* 実測値(配列分析からの結果)

** ND: 検出されず。

セリン及びトレオニンは、それぞれ分解による損失を10%及び5%として補正した値を示す。

第4表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシルエンドペプチダーゼ及びトリプシン消化物から得られたペプチドのエドマン分解により同定されたアミノ酸残基

サイクル	LEP-2 (アミノ酸 (収率) (p mole))	LEP-3 (アミノ酸 (収率) (p mole))	LEP-5 (アミノ酸 (収率) (p mole))	LEP-6 (アミノ酸 (収率) (p mole))	T-11 (アミノ酸 (収率) (p mole))	N (アミノ酸 (収率) (p mole))
1	Fyr(3060)	Asp(861)	Tyr(405)	Asp(244)	Leu(1383)	Asp(264)
2	Ala(4103)	Asn(671)	Gln(496)	Gly(856)	Thr(447)	Asn(146)
3	Leu(2016)	Val(606)	Asn(50)	Arg(72)	Leu(1053)	Val(232)
4	Val(1987)	Leu(495)	Gly(139)	Phe(866)	Leu(1344)	Leu(106)
5	Leu(901)	Leu(703)	Arg(56)	Val(1005)	Ser(346)	Leu(118)
6	Gln(1351)	Ser(85)	Gln(138)	Ile(682)	Asp(937)	Ser(15)
7	Lys(489)	Gly(227)	Ile(171)	Tyr(623)	Gly(864)	Gly(35)
8		Gln(482)	Trp(92)	Gly(457)	Asn(1028)	Gln(96)
9			Ala(156)	Pro(301)	Leu(615)	Thr(16)
10		Leu(277)	Ser(28)	Val(273)	Val(730)	Leu(77)
11		His(146)	Asn(114)	Leu(196)	Ile(504)	His(28)
12		Ala(338)	Thr(44)	Trp(40)	Tyr(797)	Ala(60)
13		Asp(443)	Asp(151)	Ser(86)	Asp(844)	Asp(78)
14		His(67)	Arg(69)	Leu(199)	His(204)	His(13)
15		Ser(22)	Arg(86)	Gly(216)	Asn(609)	Ser(7)
16		Leu(154)	Gly(75)	Pro(213)	Asn(758)	Leu(33)
17		Gln(133)	Ser(15)	(Asn)	Asn(809)	Gln(21)
18		Ala(119)	Gly(63)	Gly(105)	Asp(603)	Ala(23)
19		Gly(81)	Cys(57)	Cys(66)	Val(281)	Gly(32)
20		Ala(58)	Arg(56)	Arg(21)	Asn(264)	Ala(31)
21		Tyr(57)	Leu(79)	Arg(27)	Gly(298)	
22		Thr(24)	Thr(26)	Val(12)	Ser(193)	
23		Leu(77)	Leu(68)		Ala(201)	
24		Thr(17)	Leu(72)		Cys(150)	
25		Ile(44)	Ser(9)		Cys(182)	
26			Asp(84)		Gly(148)	
27			Gly(38)		Asp(204)	
28			Asn(51)		Ala(34)	
29			Leu(46)		Gly(72)	
30			Val(28)		Lys(17)	
31			Ile(30)		Tyr(28)	
32			Tyr(20)		Ala(38)	
33			Asp(69)		Leu(7)	
34			His(7)		Val(53)	

第5表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのキモトリプシン消化物から得られたペプチドのエドマン分解により同定されたアミノ酸残基

サイクル	CH-H3 (アミノ酸 (収率) (p mole))	CH-4B (アミノ酸 (収率) (p mole))	CH-5 (アミノ酸 (収率) (p mole))	CH-6 (アミノ酸 (収率) (p mole))	CH-10 (アミノ酸 (収率) (p mole))	CH-13 (アミノ酸 (収率) (p mole))
1	Ser(1687)	Gln(81)	Thr(142)	Asp(2395)	Ala(443)	Ala(227)
2	Leu(2813)	Asn(71)	Leu(337)	Asn(2047)	Ser(74)	Leu(116)
3	Gly(2198)	Gly(66)	Thr(102)	Val(1793)	Asn(251)	Val(141)
4	Pro(2673)	Arg(10)	Ile(207)	Leu(941)	Thr(46)	Leu(101)
5	Asn(2401)	Gln(63)	Gln(335)	Leu(1165)	Asp(133)	Gln(112)
6	Gly(1596)	Ile(60)	Asn(272)	Ser(132)	Arg(53)	Lys(68)
7	Cys(2302)	Trp(6)	Asn(346)	Gly(582)	Arg(93)	Asp(96)
8	Arg(1553)		Cys(142)	Gly(797)	Gly(85)	Gly(93)
9	Arg(1735)		Asn(228)	Thr(273)	Ser(32)	Arg(30)
10	Val(1547)		Leu(33)	Leu(596)	Gly(60)	Phe(39)
11	Asn(862)		Val(46)	Val(278)	Cys(65)	Val(74)
12	Gly(150)	</td				

〔発明の効果〕

本発明の「味覚修飾物質」は、高純度クルクリンからなる甘味を誘導する物質で、全く新しいタイプの甘味物質として、食品、飲料、飼料、ベントフード又は薬剤などに適宜含有させて用いることができる。

又、本発明の「味覚修飾物質」は、そのアミノ酸配列が決定しているので、化学的及び遺伝子工学的手法により、大量に製造することが可能で有用である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、クルクリゴ・ラチフォリアの果実から水洗、抽出、塩析操作によって得た味覚修飾物質のCM-セファロースイオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示すグラフである。

第2図は、第1図のピーク(B)の斜線部分に示された画分の、セファデックスG-100分子ふるいクロマトグラフィーの溶出パターンを示すグラフである。

第3図は、本発明の高純度クルクリンからなる

味覚修飾物質の活性を示すグラフである。

第4図は、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシリエンドペプチダーゼ消化により得られるペプチドのHPLC溶出パターンを示すグラフである。

第5図は、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのキモトリプシン消化により得られるペプチドのHPLC溶出パターンを示すグラフである。

第6図は、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのトリプシン消化により得られるペプチドのHPLC溶出パターンを示すグラフである。

第7図は、クルクリンのアミノ酸配列を示す模式図である。

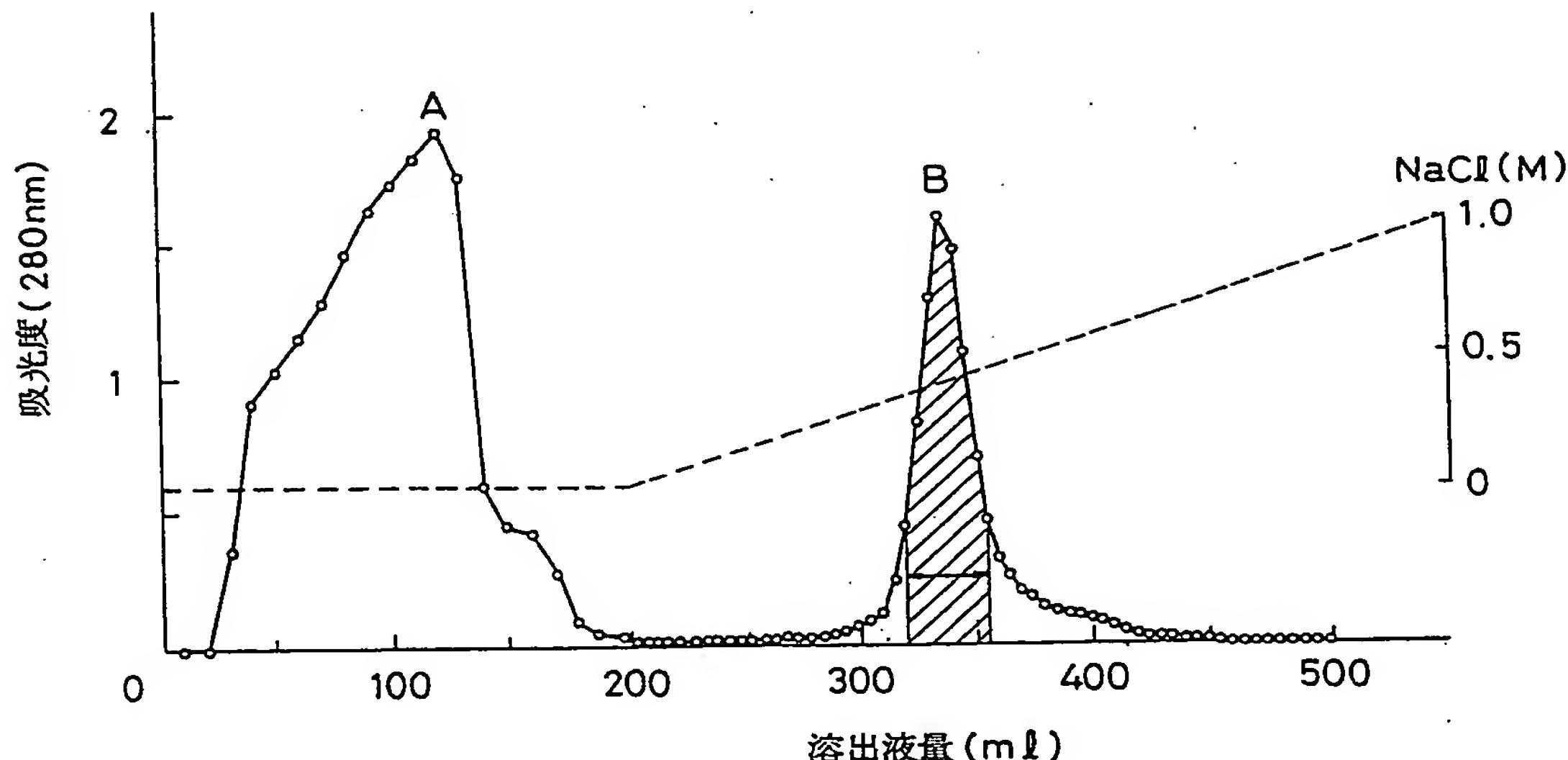
特許出願人 栗原良枝

旭電化工業株式会社

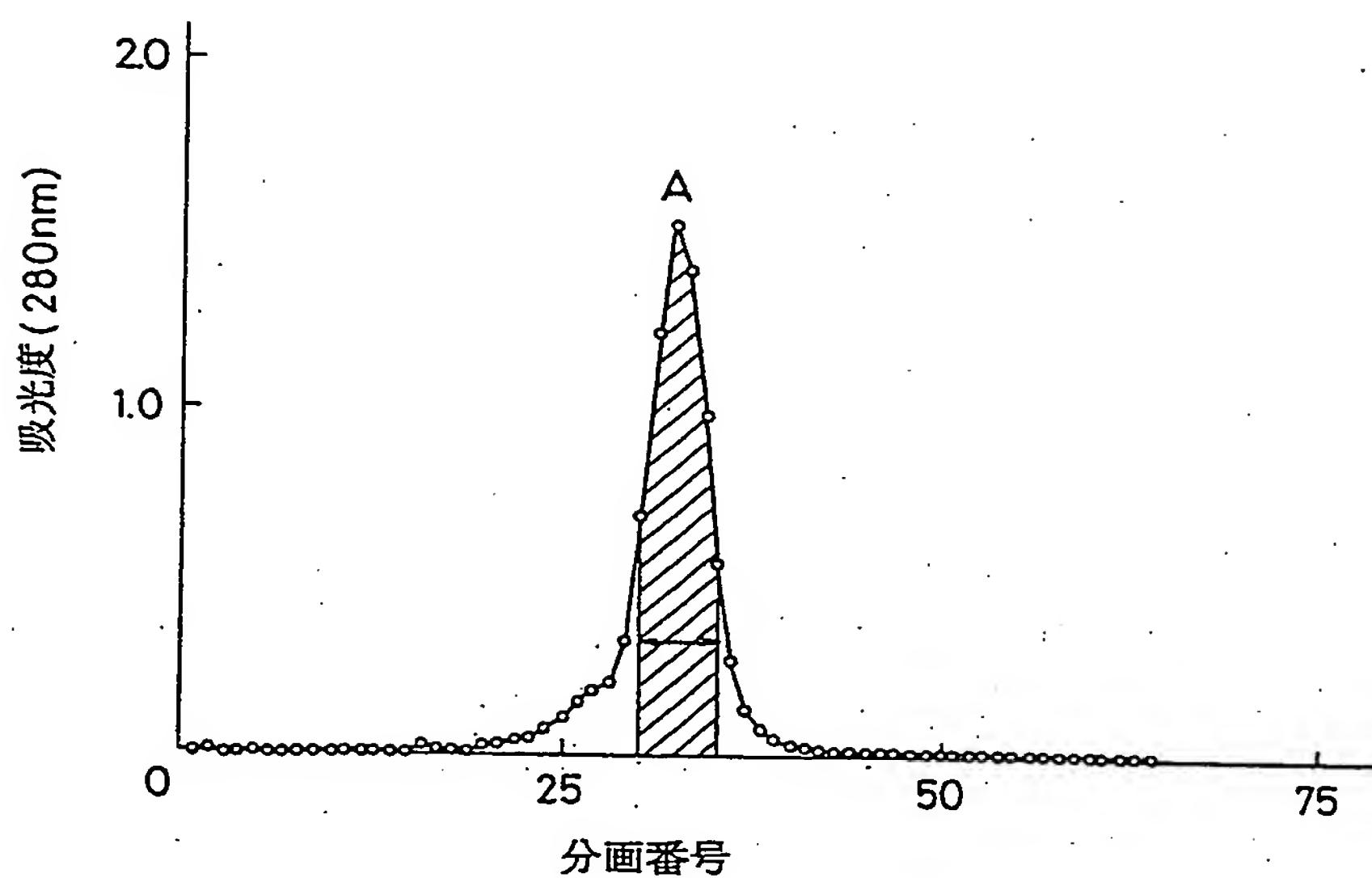
代理人 弁理士 羽鳥修



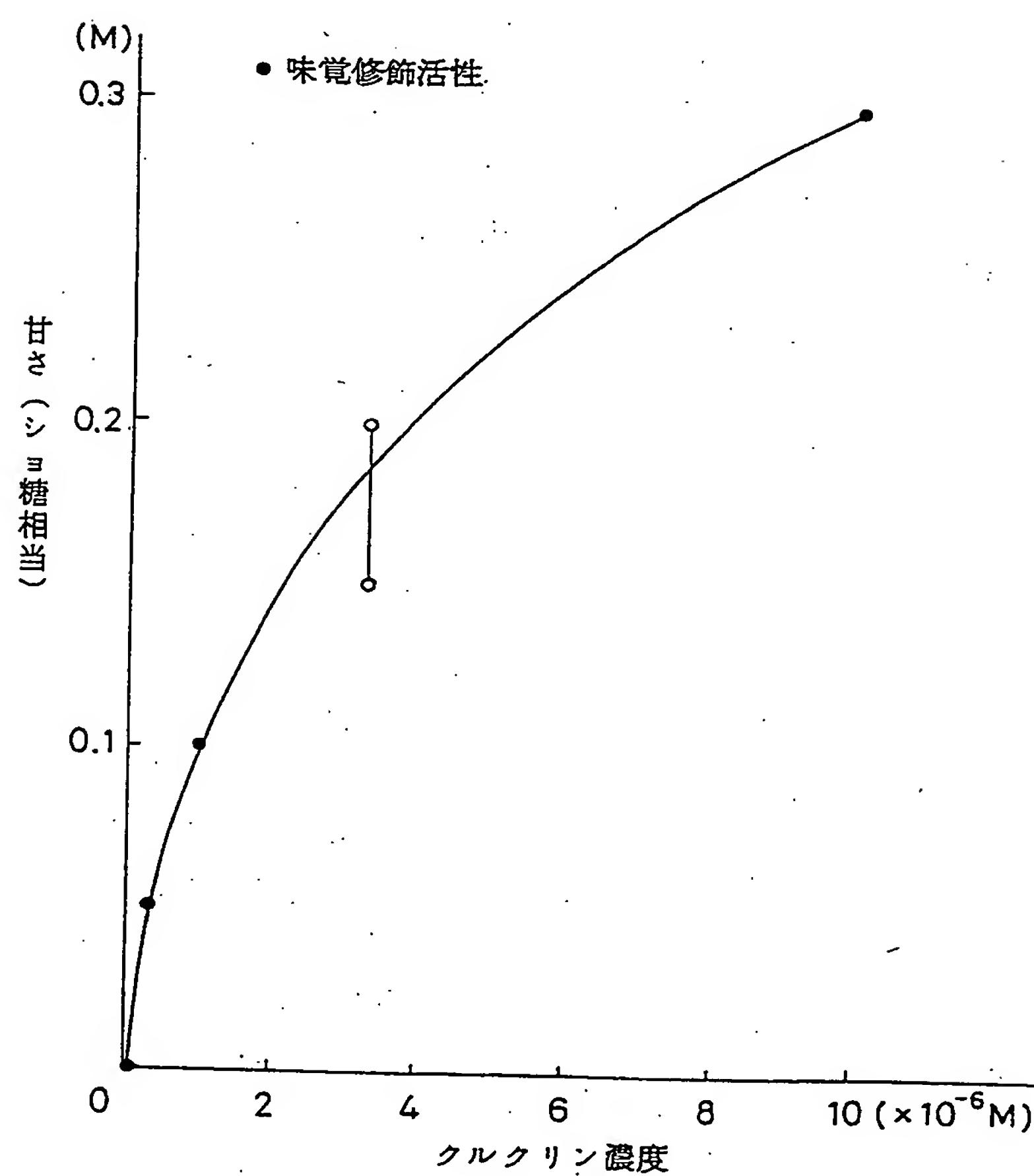
第一図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

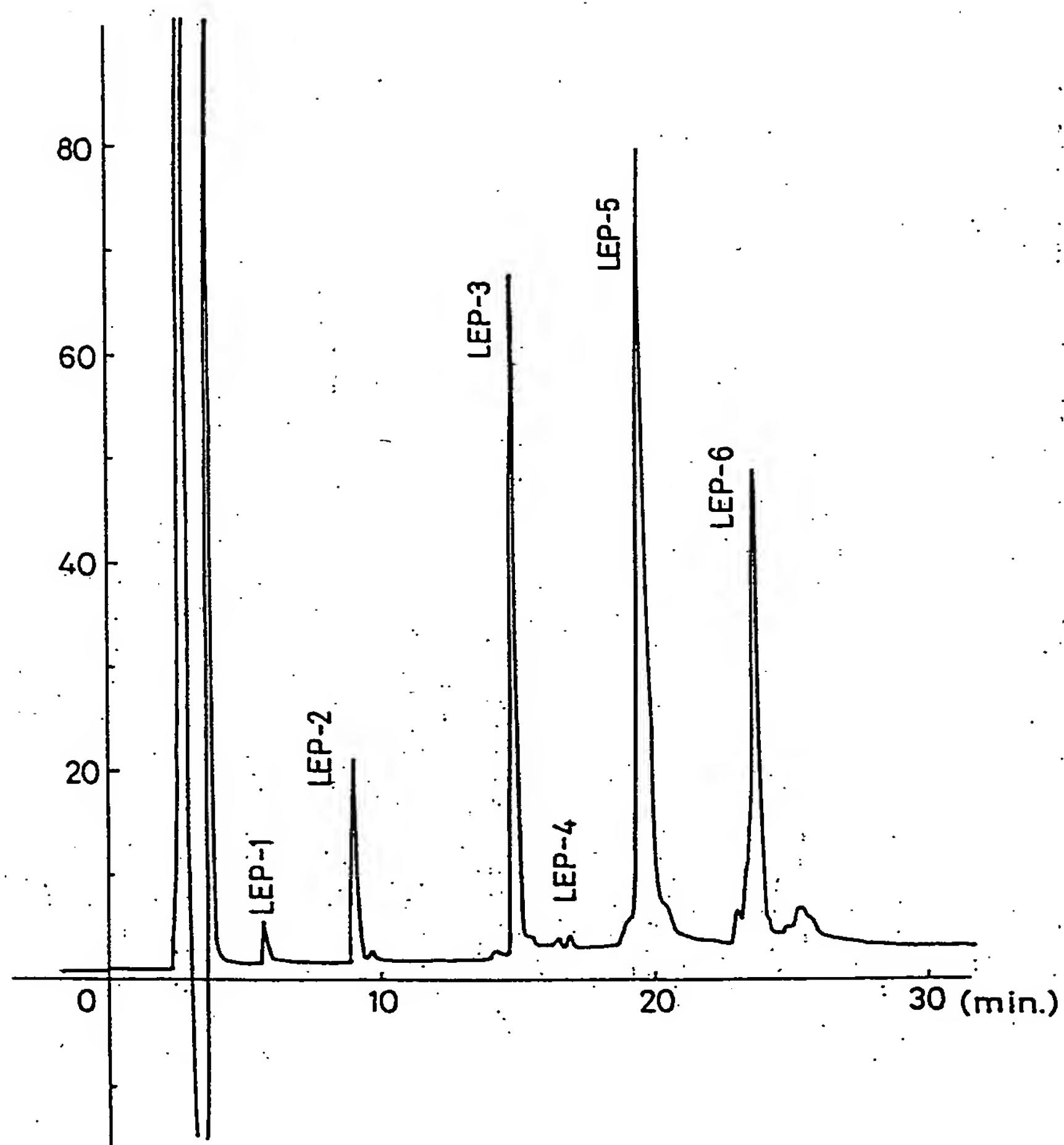
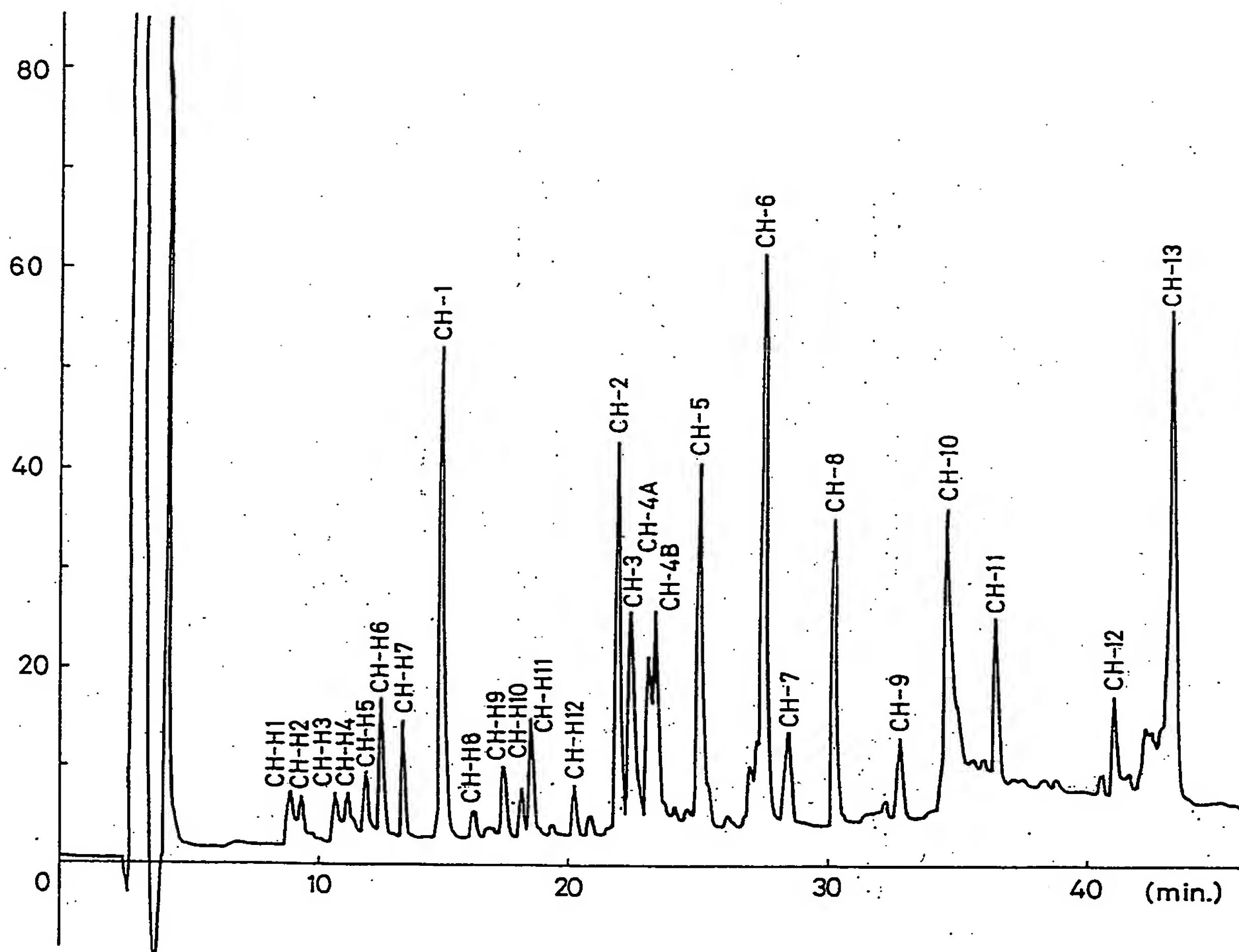
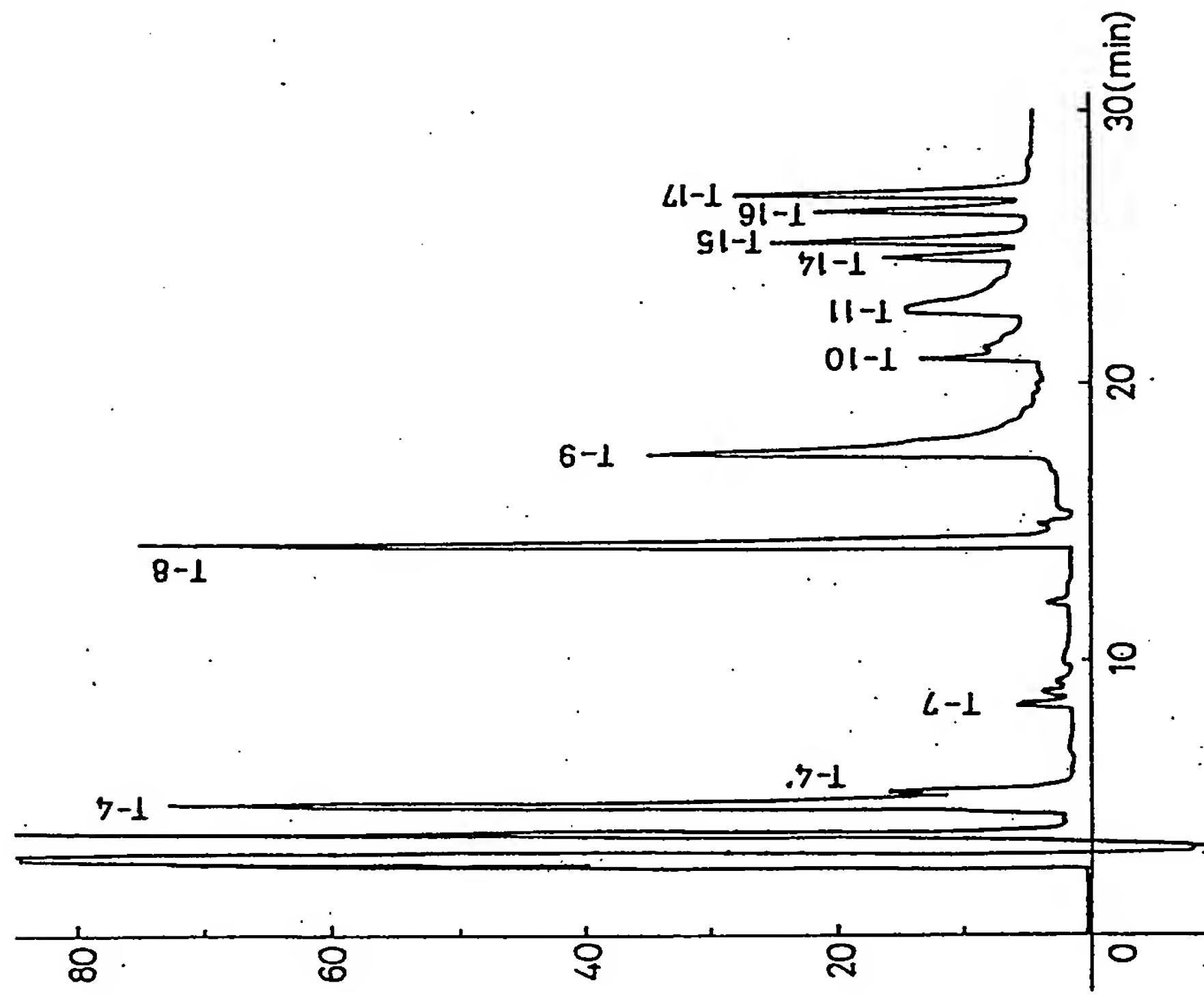


図 5



第6図



手 統 换 正 書

適

平成2年10月11日

特許庁長官 植松 敏 殿

7. 换正の内容

(1) 第2頁最終行の「ひがんばな科きんばいざさ
属」を「きんばいざさ科」と換正。

以上

1. 事件の表示

特願平1-330794号

2. 発明の名称

味覚修飾物質

3. 换正をする者

事件との関係 特許出願人

栗 原 良 枝

(038) 旭電化工業株式会社

4. 代理人

東京都港区南青山一丁目15番16号

ヤマシロビル8階

①107 ②03-479-2531㈹

(7653)弁理士 羽鳥 修



5. 换正命令の日付

自発換正（出願日から1年3ヶ月以内の換正）

6. 换正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

方式
審査

1



2